

論 文 要 旨

Reduced Autophagy in Aged Trigeminal Neurons Causes Amyloid β Diffusion

老化した三叉神経細胞におけるオートファジーの減少が
アミロイド β の拡散を引き起こす

園田 怜美

【序論及び目的】

口腔機能とアルツハイマー型認知症 (AD) 発症との関連が示唆されているが、未だ十分に解明されていない。現在歯周病原細菌による脳内の慢性炎症や、歯の喪失に伴う咀嚼障害による脳血流量の低下などが考えられているが、AD の病理学的特徴であるアミロイド β ($A\beta$) を含む老人斑と、神経細胞におけるリン酸化タウの蓄積を説明することは困難である。AD は最も一般的な認知症であり、最大のリスクファクターは加齢であることが分かっているが、神経細胞の老化と $A\beta$ 発現、特に細胞毒性の高い $A\beta_{42}$ オリゴマーの蓄積との相関は明確になっていない。

他の細胞に比べ寿命の長い神経細胞の老化にはオートファジーが関与していると考えられており、加齢に伴い増加する分子である Rubicon はオートファジーを阻害することが知られている。最近の研究ではオートファジーが神経細胞の恒常性維持に重要であるとされている。オートファジーによって細胞内の $A\beta$ が処理されるが、加齢に伴い $A\beta$ はオートファジーによって完全に除去されず細胞外に放出され、周囲の細胞に影響与える可能性がある。

我々は過去に 3 \times Tg-AD モデルマウスを用いて、AD 発症における歯の喪失による神経変性の役割を調べ、三叉神経中脳路核 (Vmes) 神経細胞の傷害後、 $A\beta_{42}$ オリゴマーの細胞外拡散が起こることを発見した。歯の喪失は、Vmes、青斑核、海馬での神経変性カスケードを引き起こし、AD の発症を加速させることが分かっている。しかし、神経細胞の老化、オートファジー、 $A\beta$ の細胞外拡散などの相互関係が、AD 発症にどのように影響するかは不明である。

そこで本研究では、 $A\beta$ を過剰発現するトランスジェニック 3 \times Tg-AD マウスと、 $A\beta$ を含むアミロイド斑を早期に生成する *App*^{NL-G-F} ノックインマウスを用いて、Vmes 神経細胞のオートファジー、 $A\beta$ の動態並びに Vmes 神経変性による $A\beta_{42}$ オリゴマー拡散への影響を検討することを目的とした。

【材料及び方法】

2~8 ヶ月齢の雌アルツハイマー病モデルマウス 2 種類(トランスジェニック 3 \times Tg-AD マウスと *App*^{NL-G-F} ノックインマウス)と野生型 C57BL/6 マウスを用いた。

AD の初期病変部位として知られる青斑核に近接しており、 $A\beta$ の沈着が顕著である Vmes 神経細胞における $A\beta$ の局在を蛍光顕微鏡および電子顕微鏡を用いて免疫組織化学的に検討した。また、Vmes 神経細胞内でのオートファジーと $A\beta_{42}$ オリゴマーの加齢変化をオートファジー関連抗体を用いて、蛍光顕微鏡を用い免疫組織化学的に検討した。

最後に上顎臼歯を抜歯して Vmes 神経細胞の変性を誘導し、抜歯による神経変性が細胞外 A β ₄₂オリゴマー拡散に関与するかどうかを検討した。

【結果】

3×Tg-AD マウスの Vmes 神経細胞にて A β の局在を確認したところ、細胞質内に膜様構造を多数認めた。膜様構造を電子顕微鏡にて観察したところ、膜様構造は二重膜構造を呈しており、二重膜の外側に A β の沈着を認めた。また、膜内部にミトコンドリアを含むマイトファジーと思われる構造も確認された。さらに、A β の沈着を Vmes 神経細胞の軸索においても認めた。軸索はオートファジーに関与しており、選択的オートファジーとの関連が示唆された。

A β 陽性であった 3×Tg-AD マウスの Vmes 神経細胞内に存在した膜様構造はオートファジーの過程で生じる膜形態と類似しており、オートファジー関連抗体を用いて A β 陽性膜様構造の特徴を調べたところ、オートファジー関連抗体との部分的な共局在を認め、A β と選択的オートファジーとの関連が示唆された。

3×Tg-AD マウスは A β の過剰発現が知られており実際のヒトとは病態が異なる点があるため、A β を過剰発現していないアルツハイマー病モデルマウスである *App*^{NL-G-F} マウスを使用し、細胞内の A β 発現量を比較したところ、細胞毒性の高いことで知られる A β ₄₂オリゴマーの発現を *App*^{NL-G-F} マウスにおいて顕著に認めたため、A β ₄₂オリゴマーの評価は *App*^{NL-G-F} マウスにて実施することとした。

A β ₄₂オリゴマーの細胞外への拡散が加齢による選択的オートファジーの低下によって引き起こされるのではないかと仮説を立て、加齢に伴い増加することが知られているオートファジー抑制マーカーである Rubicon を指標として、*App*^{NL-G-F} マウスの選択的オートファジーの低下について確認したところ、3 カ月齢以降のマウスにて Rubicon の顕著な増加を認め、加齢に伴い選択的オートファジーの低下が認められた。

細胞の老化に加え、抜歯により Vmes 神経細胞の変性が生じ細胞内容物が細胞外に拡散することを過去に確認しており、抜歯に伴う神経変性による A β ₄₂オリゴマーへの影響を確認したところ、抜歯により Vmes 神経細胞の形態学的変化を認め神経変性が誘導されており、抜歯群において A β ₄₂オリゴマーの細胞外への拡散を認めた。

【結論及び考察】

本研究では、AD モデルマウスにおいて、Vmes 神経細胞内に A β の蓄積を認め、選択的オートファジーとの関連を認めた。神経細胞の恒常性にオートファジーは必要不可欠であるが、加齢に伴い Vmes 神経細胞における Rubicon の発現が増加する。Rubicon は神経細胞におけるオートファジーを阻害し、細胞内で消化されなかった A β ₄₂オリゴマーの神経細胞外への拡散を促進する。また、細胞毒性が高い A β ₄₂オリゴマーの細胞外拡散は、3×Tg-AD マウスよりも *App*^{NL-G-F} マウスでより多く認めた。

また、*App*^{NL-G-F} マウスにて抜歯により Vmes 神経細胞変性を認めた。これにより神経細胞のオートファジーが抑制され、未消化の A β ₄₂オリゴマーが大量に拡散した可能性がある。3×Tg-AD マウスの先行研究では、抜歯が Vmes、青斑核、海馬での神経変性カスケードを介して AD 発症の引き金となることが示されているが、今回の *App*^{NL-G-F} マウスの実験では、多くの A β ₄₂オリゴマーが細胞外に拡散していた。したがって、AD に関連する遺伝子変異を持つ患者の認知機能が低下する時期に抜歯をすることは、疾患進行の潜在的なリスクにつながる可能性が示唆された。

今回の結果は、オートファジーが Vmes 神経細胞の恒常性を維持し、加齢によるオートファジーの機能低下と神経変性が A β ₄₂オリゴマーの細胞外への拡散を促進し、AD の発症につながる可能性を示唆するものであった。